

JP00/01494

09/92613

PCT/JP00/01494

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

13.03.00

REC'D 28 APR 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 3月18日

EKU

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第073690号

出願人  
Applicant(s):

扶桑薬品工業株式会社

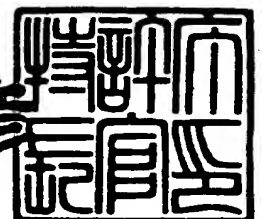
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3025829

【書類名】 特許願

【整理番号】 164284

【提出日】 平成11年 3月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/06

【発明者】

    【住所又は居所】 山梨県東八代郡石和町八田 7 3 - 5

    【氏名】 杉山 篤

【特許出願人】

    【識別番号】 000238201

    【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 0 号

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100062144

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 青山 稔

【選任した代理人】

    【識別番号】 100068526

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096079

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 大角 美佐子

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 013262

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9700672

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 cAMPおよびアデニル酸シクラーゼの酵素的蛍光定量アッセイ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPからなる非環状アデニンヌクレオチド類および内因性グルコース-6-リン酸をより迅速に除去する方法であって、生物学的試料を非環状アデニンヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸を除去するのに効果的な量のアピラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼを用いて処理することを特徴とする方法。

【請求項2】 生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定方法であって、

クリーニング反応：生物学的試料を内因性ATP、ADPおよびAMPからなる非環状アデニンヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸を除去するのに効果的な量のアピラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼを用いて処理する工程、

変換反応：生物学的試料中のcAMPをAMPに酵素的に変換する工程、

検出反応：放射性試薬を用いることなくAMP量を測定する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項3】 上記クリーニング反応において、上記試料にさらに、有効量のグルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼを加えて処理し、上記試料から内因性グリコーゲンを酵素的に除去することを含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】 上記変換反応が上記試料を有効量のホスホジエステラーゼによる処理により行われる、請求項2記載の方法。

【請求項5】 cAMPからAMPへの上記変換反応の酵素がcAMPを変換させた後にキレート剤により不活性化される、請求項2記載の方法。

【請求項6】 キレート剤がEDTAである、請求項5記載の方法。

【請求項7】 上記検出反応が、上記試料に添加されたグリコーゲン及び無

機リン酸の存在下、グリコーゲンホスホリラーゼと接触させて、グルコース-1-リン酸に変換されることを含み、そしてこの変換が上記AMPによってin vitroで活性化されるものである、請求項2記載の方法。

【請求項8】 上記検出反応において、さらに、グルコース-1-リン酸をグルコース-6-リン酸に変換させるのに有効な量のホスホグルコムターゼで上記試料を処理し、ついでグルコース-6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンに変換するのに有効な量のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび $\text{NADP}^+$ で上記試料を処理することによって、グルコース-1-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンおよび $\text{NADPH}$ に変換する、請求項7記載の方法。

【請求項9】 上記検出反応において、さらに、上記試料を水の存在下で加熱して、6-ホスホグルコノラクトンを6-ホスホグルコン酸に変換し、ついでこの6-ホスホグルコン酸をリブローズ-5-リン酸および $\text{NADPH}$ に変換するのに有効な量の $\text{NADP}^+$ を添加することを含む、請求項8記載の方法。

【請求項10】 生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定方法であって、

クリーニング反応：生物学的試料を、上記試料中のcAMP以外の内因性非環状アデニンヌクレオチド類、および内因性グルコース-6-リン酸を酵素的に除去するのに有効な量のアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼで処理する工程、

変換反応：生物学的試料中のcAMPをATPに酵素的に変換する工程、

検出反応：ATPをフルクトース-6-リン酸に酵素的に変換し、フルクトース-6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンおよび $\text{NADPH}$ に酵素的に変換後、放射性物質を用いずに $\text{NADPH}$ 濃度を測定する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項11】 上記クリーニング反応において、さらに、上記試料を有効量のグルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼで処理し、上記試料から内因性グリコーゲンを酵素的に除去することを含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】 上記検出反応において、フルクトース-6-リン酸を6-ホ

スホグルコノラクトンおよびNADPHに酵素的に変換後、さらに、引き続き反応混合物を加熱し、そして上記反応混合物に6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびNADP<sup>+</sup>を添加することによって上記6-ホスホグルコノラクトンをリブローズ-5-リン酸およびNADPHに変換することを含む、請求項10または11記載の方法。

【請求項13】 上記クリーニング反応のcAMP以外の内因性非環状アデニンヌクレオチド類が、ATP、ADP、AMPの1種またはそれ以上の混合物である、請求項10記載の方法。

【請求項14】 上記変換反応において、cAMPからATPの変換が有効量のホスホジエステラーゼ、ミオキナーゼおよびピルビン酸キナーゼの組み合わせで行われる、請求項10記載の方法。

【請求項15】 上記検出反応において、ATPからフルクトース-6-リン酸の変換がヘキソキナーゼおよびピルビン酸キナーゼの組み合わせで行われる、請求項10記載の方法。

【請求項16】 上記検出反応において、フルクトース-6-リン酸から6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHの変換がホスホグルコイソメラーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの組み合わせで行われる、請求項10記載の方法。

【請求項17】 上記検出反応において、ATPをフルクトース-6-リン酸に変換する酵素が非環状アデニンヌクレオチド類の変換後にキレート剤により不活性化される、請求項10記載の方法。

【請求項18】 キレート剤がEDTAである、請求項17記載の方法。

【請求項19】 上記生物学的試料が、哺乳動物組織である、請求項1、2または10記載の方法。

【請求項20】 上記生物学的試料が、生物学的液体である請求項1、2または10記載の方法。

【発明の詳細な説明】

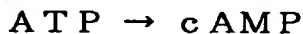
【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ATPから内因性アデニル酸シクラーゼによって生成されるcAMP(サイクリックアデノシン3',5'-リン酸)と、ATP(アデノシン-三リン酸)、AMP(アデノシン-リン酸)、ADP(アデノシン-二リン酸)およびこれらの混合物からなる群から選択される内因性の非環状アデニンヌクレオチド類を含む生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性を、放射性試薬を使用しないで測定する方法を提供するものであり、要約すれば、(1)上記試料中のcAMP以外の内因性非環状アデニンヌクレオチドおよびグルコース-6-リン酸を酵素的に除去するためにアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリフォスファターゼの有効量を混合し、(2)cAMPをAMPに酵素的に変換し、(3)放射性物質を用いることなくAMPの量を測定することを特徴とする方法に関する。

## 【0002】

アデニル酸シクラーゼ(アデニリルシクラーゼ、アデニルシクラーゼ、EC4.6.1.1)は、 $Mg^{2+}$ または $Mn^{2+}$ の存在下で



を触媒する酵素である。

## 【0003】

アデニル酸シクラーゼは細胞膜に局在しており、種々の基本的なホルモンおよび神経伝達物質のシグナル形質導入カスケードとして重要な役割を果たしている。

例えば、アデニル酸シクラーゼ活性を測定することにより、ヒトの心臓移植や鬱血性心疾患時に現れる生理学的変化を理解することができる [M.R.Bristow et al., New Engl.J.Med., 第307巻, 205頁(1982年); K.G.Lurie et al., J.Thorac.Cardiovasc.Surg., 第86巻, 195頁(1983年)]。

## 【0004】

このアデニル酸シクラーゼ活性は、アデニル酸シクラーゼの触媒作用によりATPから合成されるcAMP量の変化を測定することによって求めることができる。

しかし、cAMPの組織レベルでの変化をモニターすることが困難であるため制

限されている。

【0005】

cAMP (サイクリックアデノシン3',5'-リン酸)は1957年、肝臓においてアドレナリンおよびグルカゴンの血糖上昇作用を仲介する因子として見出され [E.W.Sutherland et al., J.Am.Chem.Soc., 第79巻, 3608頁(1957年)]、その後、副腎皮質ホルモン(ACTH)、黄体形成ホルモン(LH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、副甲状腺刺激ホルモン(PTH)などの種々のホルモンやプロスタグランジンなどの生理活性物質もcAMPを介して作用が発揮されることが明らかとなった。すなわち、cAMPは、ペプチドホルモンや活性アミンが分泌されて目標の細胞に到達した際、細胞内で酵素反応を進めるための情報伝達を担い、いわゆるセカンドメッセンジャーとしての機能を有している。

【0006】

cAMPは生体内では膜に局在するアデニル酸シクラーゼによってATPから合成され、ホスホジエステラーゼによって5'-AMPに分解される。細菌や動物界に広く存在するが、非常に微量である(定常濃度0.1~1 nモル/湿重量)。cAMPの定量法としては、cAMP結合タンパク質を用いる方法または放射免疫法が簡便である。cAMP含量は細胞の栄養、増殖、分化、適応状態に左右され敏感に変動する。

【0007】

多種多様な哺乳動物および非哺乳動物の組織や体液中のcAMPを測定することは、細胞生存度、内分泌ホルモン軸機能、アデニル酸シクラーゼ活性およびホスホジエステラーゼ活性を評価するための有用な方法と成り得る。さらに、cAMP測定を利用して、シグナル形質導入、リボソームタンパク質合成、発生期タンパク質の転位および他の主要な細胞機能で重要な役割を果たしているGタンパク質(グアニンヌクレオチド結合タンパク質)ファミリーをはじめとする、多数のシグナル形質導入タンパク質の活性を評価することができる [Bourne et al., Nature, 第348巻, 125頁(1990年)]。

【0008】

また、cAMPの測定は、特定の細胞、組織、器官または体液中の環状ヌクレ



オチドの値を変動させる可能性のある他の内因性及び外来性化合物(例えば、一酸化二窒素)の評価に使用することができる。

#### 【0009】

生物中の主要な調節ホルモン/タンパク質である、エピネフリン、ノルエピネフリン、アドレノコルチコトロピン(ACTH)、バソプレシン、グルカゴン、チロキシン並びに甲状腺刺激及びメラノサイト刺激ホルモンをはじめとする多数のホルモンは、セカンドメッセンジャーとしてcAMPを使用する。これら全てのホルモンおよび調節物質の活性は、本発明の測定方法を適用して組織、血清、体液および全ての細胞培養物(細胞及び培地)中で測定することができる。これらホルモンの測定は、ホルモン不均衡から特定の病状となる可能性のある多種多様な疾病状態について実施することができる。

#### 【0010】

ホルモンまたは調節タンパク質が特定のレセプターと相互作用すると、セカンドメッセンジャー(cAMP)が、カスケードとして生成される。cAMPの生成は場合によっては、特定のホルモンシグナル形質導入経路の一部としてcAMPの減少を使用するホルモンによって特異的に抑制することもできる。この調節タンパク質またはホルモンとレセプターの相互作用の結果は、(1)例えば、イオンチャンネルの変化による細胞透過性の変動、(2)cAMP濃度に感受性の酵素触媒反応速度の変動、(3)他の酵素の合成および分解を含むタンパク質合成速度の変動が考えられる。cAMPの測定は、ホルモンまたは調節タンパク質がレセプターと相互作用した後に、これらの結果を直接および間接的に測定するために使用することができる。

#### 【0011】

具体的には、cAMPの測定は、試料中のcAMPの分解を防止することによってアドレナリン作動性神経系を刺激するアミノフィリンまたはテオフィリンのような医薬品レベルのマーカースとして使用することができる。細胞培養物中のcAMPの測定を使用して特定のホルモン、調節タンパク質および医薬品を評価することができ、その際cAMPはシグナル形質導入過程での生体結合を示す。

#### 【0012】

cAMP測定はまた、特定のホルモンまたは調節タンパク質の不存在下あるいは存在下で細胞を試験することによって、細胞の生存度および安定性を評価するために使用することもできる。例えば、グルカゴンによる肝臓細胞(肝細胞)中のcAMPの測定することにより、肝細胞の生存度を評価することができる。これは、例えば、器官および/または細胞の移植、例えば心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、皮膚および脳の細胞移植に有用である。

#### 【0013】

細胞cAMP値を高めるかまたは低下させる多種多様なホルモン、調節タンパク質および医薬品で活性化した後の生検試料から得られる細胞の応答性の測定は、細胞機能を詳細に評価する方法として使用することができる。

#### 【0014】

特殊な臨床例としては、心筋層の応答を評価するために心臓生検でcAMPを測定することが挙げられる。心筋症の心臓細胞は、 $\beta$ -アドレナリン作動性刺激後のcAMP含有量が上昇しても応答しない。心疾患の重篤度および幾つかの医薬品、例えば $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤およびアンギオテンシン変換酵素インヒビターの有効性の診断は、正常な心臓と心筋症心臓から得られる生検試料の応答性を比較することによって行うことができる。更に、細胞内または動脈若しくは静脈循環内へのcAMP放出は、虚血、低酸素症または医薬品若しくはホルモン刺激のような種々の異なる生理学および非生理学のストレスに対する器官および/または組織の応答のインディケーターとして使用することができる。組織若しくは体液中のcAMP値は、この方法を用いて血球および血小板を含む殆ど全ての哺乳動物細胞または体液中で測定することができる。幾つかの組織では、潜在的腫瘍細胞試料の場合に、腫瘍原性および/または侵入性に対する指標として特異的な刺激剤に応答するcAMP値を測定することができる。他の場合には、cAMP合成または分解を変える可能性のある特異的な治療法の有効性を決定するためにcAMPの測定を使用することができる。

#### 【0015】

上記のように、cAMPはセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達において、重要な役割を果たしていると同時に、様々な生理的機能を有していること

から、アデニル酸シクラーゼの触媒作用によりATPから合成されるcAMP量を測定し、さらにアデニル酸シクラーゼ活性を求めたり、cAMPの挙動を解明することは、基礎医学研究分野のみならず、臨床医学の分野においても非常に意義深いことといえる。

#### 【0016】

##### 【従来の技術】

アデニル酸シクラーゼ活性の測定は、ATPを基質として生成したcAMPを定量することによって行う。cAMPの定量は、(1)標識されたATPを基質とする方法と(2)非標識ATPを基質として用いる方法に区別することができる。

#### 【0017】

(1)の標識されたATPを基質とする方法では、放射性同位元素で標識されたATP(例えば $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP)を基質とし、アデニル酸シクラーゼの作用により合成された放射性標識cAMP( $[\text{}^{32}\text{P}]$ cAMP)をATPから分離し、その放射活性を測定する[Y.Salomon et al., Anal.Biochem., 第58巻, 541頁(1974年); R.A.Johnson et al., In Method in Enzymology, 第195巻, 3頁(1991年)]。この方法においては、イオン交換樹脂および酸化アルミニウムカラムを用いた連続アフィニティクロマトグラフィーを用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPと $[\text{}^{32}\text{P}]$ cAMPを分離している。

#### 【0018】

しかし、上記(1)の定量法は高感度である反面、高価で危険性の高い放射性標識化合物を使用しなければならない。

#### 【0019】

一方、(2)の非標識ATPを基質として用いる方法は、①非標識ATPから生成したcAMPを放射性物質で標識したcAMPと競合的に対応する抗血清に対して抗原抗体反応させ、結合抗体の放射活性を測定してcAMPを定量する、いわゆるラジオイムノアッセイと、②cAMP依存性プロテインキナーゼとcAMPの特異的結合を利用し、cAMP依存性プロテインキナーゼと結合した $^3\text{H}$ -cAMPの放射能を測定する、プロテインバインディングアッセイ[A.G.Gilman et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 第67巻, 305頁(1970年)]に分類することがで

きる。

#### 【0020】

この(2)の非標識ATP基質を用いる方法は、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼによるcAMPの分解を補正できないため、ホスホジエステラーゼ活性の強い検体には不適當である。

#### 【0021】

さらに、安全性及び環境に与える影響を考慮すれば、このような放射性物質の使用は極力避けるべきである。従って、アデニル酸シクラーゼ活性およびその指標となるcAMPの定量のため高感度の非放射性定量法の開発が望まれていた。

#### 【0022】

しかしながら、大部分の哺乳動物の組織中において、cAMPの濃度は非常に低いため、放射性物質を用いないで測定することは容易ではない。また、AMPやADP、ATPなどの試料中の非環状アデニンヌクレオチド類が、cAMPの数百倍から数十万倍以上の濃度で共存しており、しかも化学構造が類似していることから、妨害物質として作用し、cAMPの定量を一層困難なものとしている。特にATPはcAMPの1億倍の濃度で存在していることもあり、このような内因性のATPを完全に除去しない限り、正確なcAMPの測定は実質的に不可能であった。

#### 【0023】

一方、cAMPはホスホジエステラーゼの作用によりAMPに変換されるが、AMPの測定については、放射性物質を用いない方法が開示されている。Lowryらは、還元型ピリジンヌクレオチドの蛍光を用いた高感度定量法 [O.H.Lowry et al., A Flexible System of Enzymatic Analysis, Harcourt Brace Jovanovich, New York(1972年); F.M.Matschinsky et al., J.Histochem.Cytochem., 第16巻, 29頁(1968年)] を開示している。これは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(NADPH)の340nmにおける吸光度が0.1mmolあたり0.617を示すことを利用し、試料の吸光度値からNADPHの絶対濃度を求める方法である。

#### 【0024】

また、グリコーゲンをグルコース-1-リン酸に変換する酵素であるグリコーゲンホスホリラーゼが無機リン酸( $P_i$ )の存在下でAMPにより活性化されることを利用したAMPの測定も提案されている [E.Helmreich et al., Biochemistry, 第52巻, 647頁(1964年); 同上, 第51巻, 131頁(1964年); M.Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)]。この方法では、グリコーゲンがグルコース-1-リン酸に変換される量からグリコーゲンホスホリラーゼ活性を求め、この活性を指標として、AMPの量を測定することができる。さらに、AMPを高感度に測定する方法は、Lurie等によって開発されている [K.Lurie et al., Ann.J.Physiol., 第253巻, H662頁(1987年)]。

## 【0025】

cAMPやアデニル酸シクラーゼの分析感度や特異性を高めるために、試料中の非環状アデニンヌクレオチド類を酵素分解および/またはクロマトグラフィーにより除去する方法も知られている [N.D.Goldberg et al., Anal.Biochem., 第28巻, 523頁(1969年); B.McL.Breckenridge, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 第52巻, 1580頁(1964年)]。

## 【0026】

しかしながら、これらの先行技術においては、妨害物質である内因性のADPやATPを完全には除去できないためcAMPの測定は不可能であると結論されていた。それゆえ、放射性物質を使用することなく、生物学的試料中のcAMP量およびそれに基づくアデニル酸シクラーゼ活性を高感度に求める手段は実質的にはなかったことになる。

## 【0027】

本発明者は、先に、全く新しい観点からアデニル酸シクラーゼ活性の測定およびcAMP量の定量方法の開発を試み、鋭意検討した結果、妨害物質であるATPやADP、AMPなどの試料中の内因性非環状アデニンヌクレオチド類やグルコース-6-リン酸を酵素を用いて選択的に除去した後、試料中のcAMPをAMPに酵素的に変換し、さらにAMPをATPに変換し、そして、フルクトース-6-リン酸を経由してグルコース-6-リン酸に変換した後、NADPHに変換し、このNADPH濃度を蛍光光度法で測定し、cAMP濃度と相関させることに

より、有害な放射性物質を用いることなく、酵素反応・化学反応のみで、cAMP量およびそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性を測定することに成功した(WO94/17198)。

【0028】

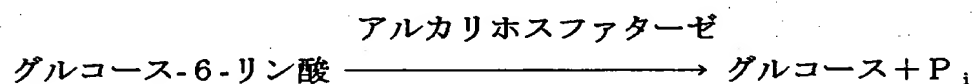
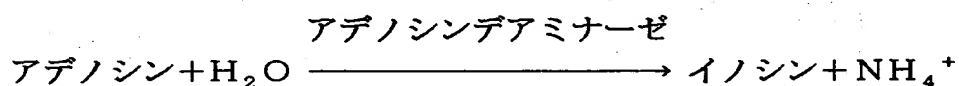
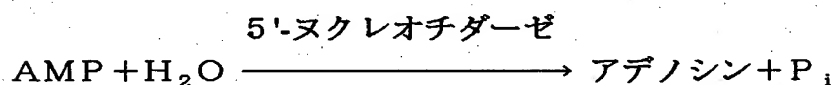
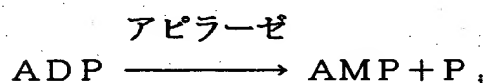
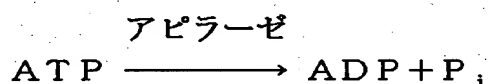
そして、この方法を用いることで、 $\mu\text{g}$ オーダーの生物学的試料中のcAMP量をpmolまたはfmolレベルで正確に定量することが可能となった[A.Sugiyama et al., Anal.Biochem., 第218巻, 20頁(1994年); A.Sugiyama et al., J.Clin.Lab., 第8巻, 437頁(1994年); A.Sugiyama et al., Anal.Biochem., 第225巻, 368頁(1995年); A.Sugiyama et al., Yamanashi Med.J., 第10巻, 11頁(1995年)参照]。

【0029】

上記方法の反応式を以下に示す。

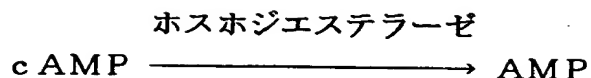
工程1：クリーニング反応(試料中の内因性非環状ヌクレオチド類および内因性グルコース-6-リン酸の除去)

【化1】



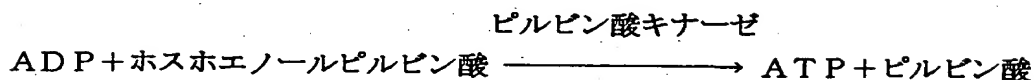
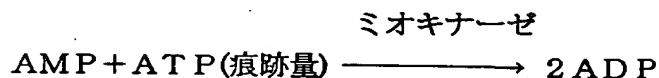
工程2：変換反応1(cAMPからAMPへの変換)

【化 2】



工程 3 : 変換反応 2 (AMP から ATP への変換)

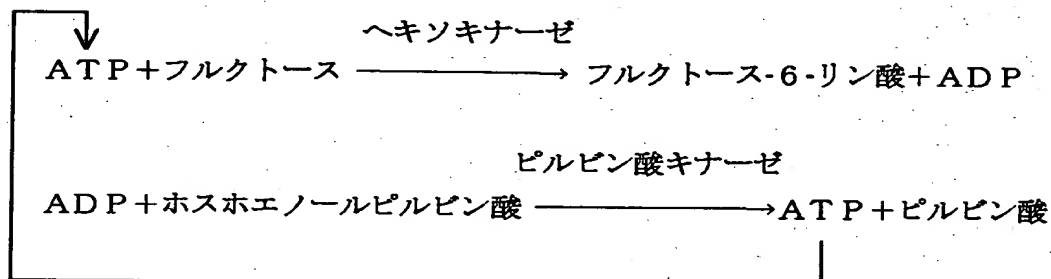
【化 3】



工程 4 : ATP-ADP サイクル反応による増幅

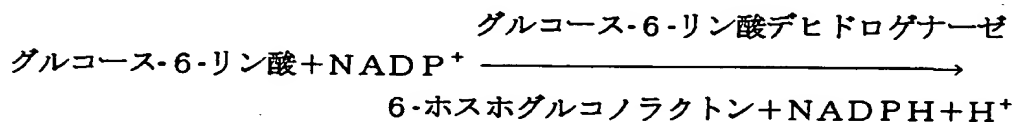
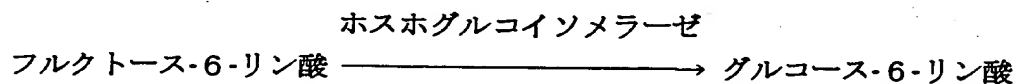
(測定感度を 6000 ~ 1 万倍に増幅する)

【化 4】



工程 5 : 検出反応 (NADPH の蛍光光度測定)

【化 5】



【0030】

この方法は、原理的に非常に優れた cAMP の定量手段であり、かつ、理論的

にも正確なものであるが、クリーニング反応に要する時間が長い、サイクル反応後に加熱による酵素を失活させる際に、試料の白濁が生じる、などの点で改良の余地があった。

【0031】

【課題を解決するための手段】

本発明は、より簡便で、迅速な cAMP 量やアデニル酸シクラーゼ活性の測定手段であって、しかも放射性物質を使用しない測定方法の開発を目指して鋭意研究した結果完成されたものである。

【0032】

本発明は、先に本発明者らが開示した酵素反応および蛍光光度法を採用したアデニル酸シクラーゼ活性測定法および cAMP 定量法(WO94/17198)の改善を図ったものである。即ち、(1)クリーニング反応において、5'-ヌクレオチダーゼの使用を取りやめることにより、反応時間を1時間から5分乃至10分間と劇的に短縮することに成功し、(2)サイクル反応において、反応後の酵素の失活方法を加熱に代えて、EDTAなどのキレート剤を用いて試料中の  $Mg^{2+}$  をキレート処理して除去し、酵素を失活させることにより、試料の白濁を防止した。これにより、続いて行う検出反応の精度が向上した。また、(3)従来2段階であった変換反応を1段階とすることで、より簡便な操作を可能とした。そして、(4)検出反応において試薬等の濃度を再検討し、最適化した。これらの改良を加えることによって、生物学的試料中の cAMP 量およびそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性をより迅速、且つ高感度に測定できる酵素的蛍光定量アッセイまたは分光光度アッセイを提供することが可能となった。

【0033】

なお、本発明は後述するように、グアニン調節タンパク質および cAMP 特異的ホスホジエステラーゼの活性を測定するために使用することもできる。

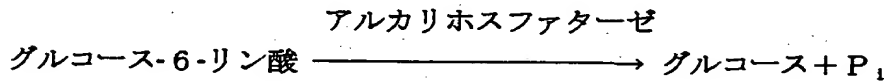
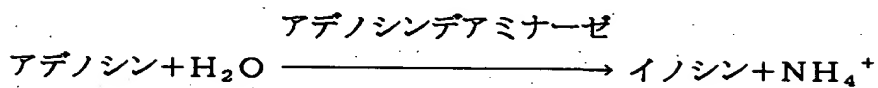
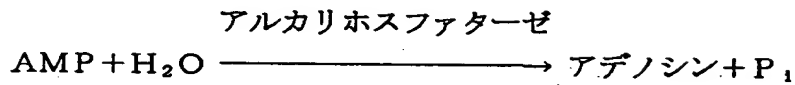
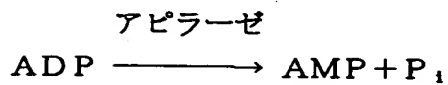
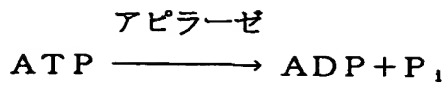
【0034】

本発明の cAMP の測定に用いられる反応を以下に記載する。

ステップ1-クリーニング反応(試料中の内因性非環状アデニンヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸の除去)



【化6】

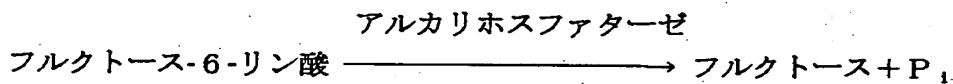


【0035】

ステップ1-クリーニングオプション反応1

(フルクトース-6-リン酸の除去)

【化7】

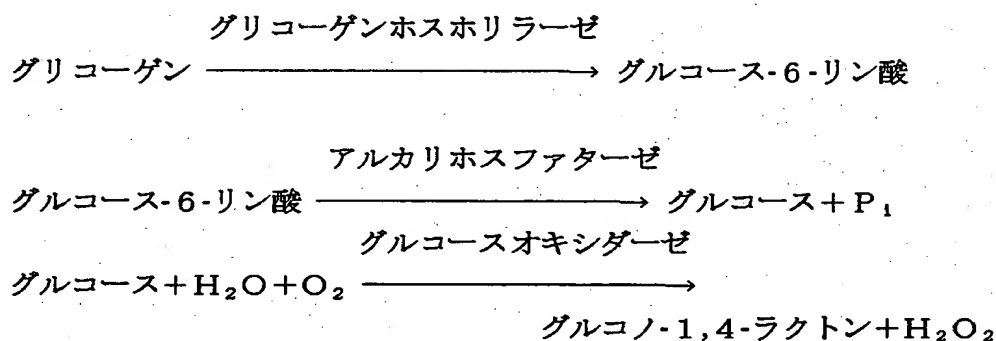


【0036】

ステップ1-クリーニングオプション反応2

(試料中の内因性グリコーゲンの除去)

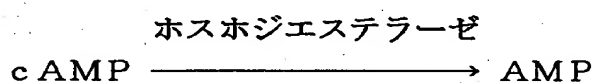
【化 8】



【0037】

ステップ 2-変換反応 (AMP 化反応)

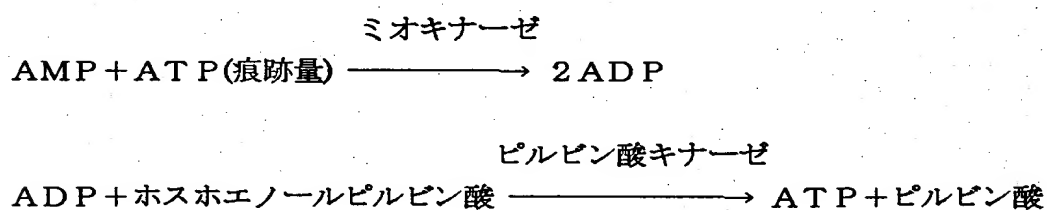
【化 9】



【0038】

ステップ 2-変換オプション反応 1 (ATP 化反応)

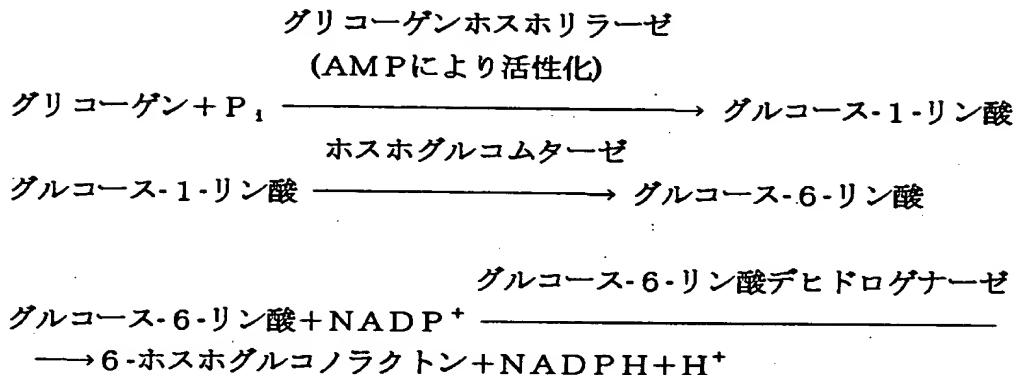
【化 10】



【0039】

ステップ 3-検出反応 1 (NADPH の蛍光光度測定)

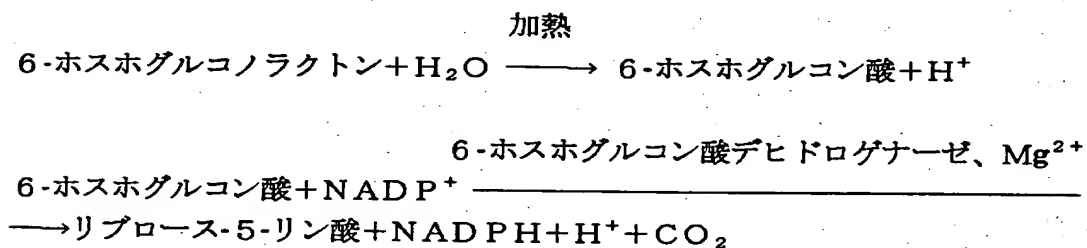
【化 1 1】



【0040】

ステップ3-検出オプション反応1(6-ホスホグルコノラクトンの分解)

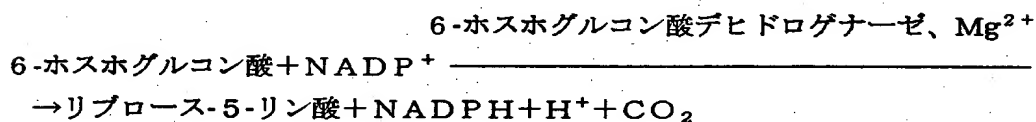
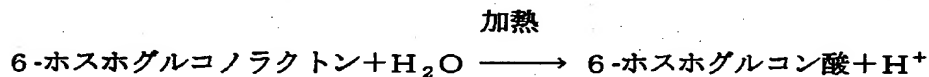
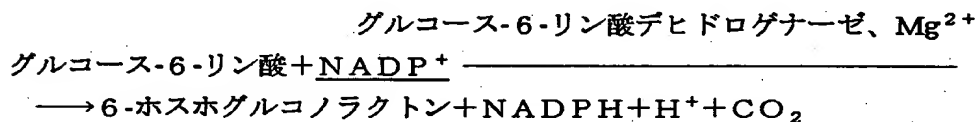
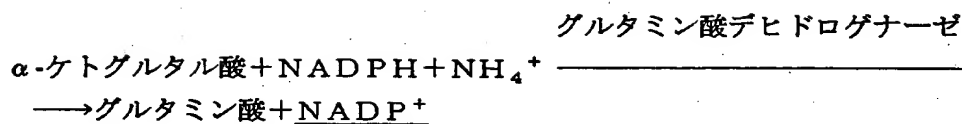
【化 1 2】



【0041】

ステップ3-検出サイクル反応1

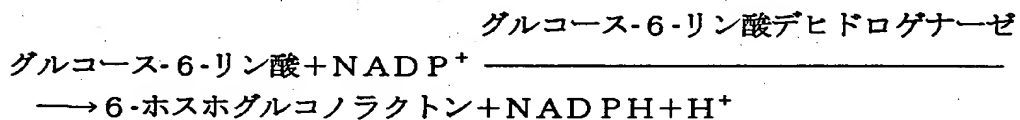
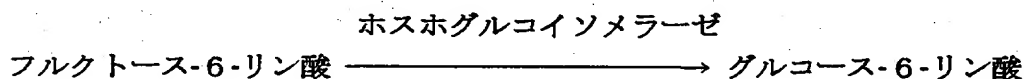
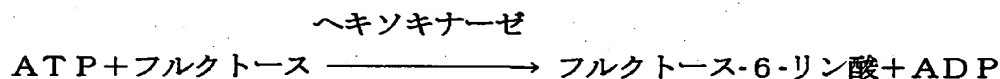
【化 13】



【0042】

ステップ3 - 検出反応2 (NADPHの蛍光光度測定)

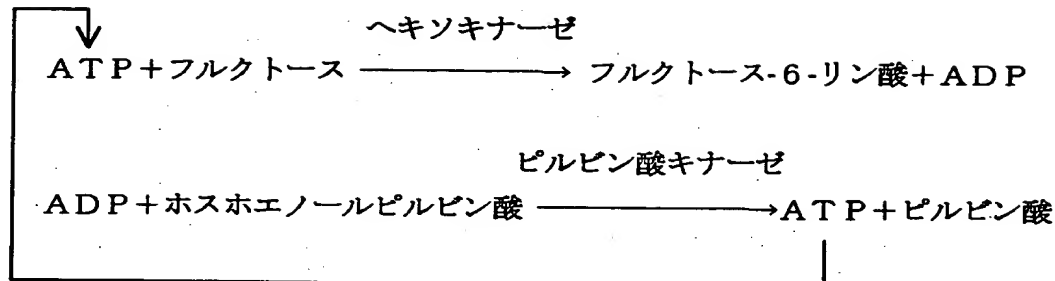
【化 14】



【0043】

ステップ3 - 検出サイクル反応2 (ATP-ADPサイクル反応による増幅  
(測定感度を6000～1万倍に増幅する))

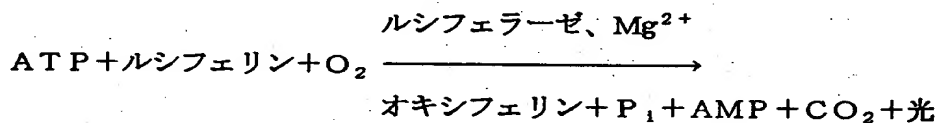
【化 15】



【0044】

ステップ3-検出反応3(ATPの検出)(ルシフェラーゼ反応)

【化 16】



【0045】

ステップ1-クリーニング反応(試料中の内因性非環状アデニンヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸の除去)

本発明は、アピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼの混合物により、試料中のcAMP以外の内因性非環状アデニン残基を有する化合物(アデノシン、ATP、ADPおよびAMP)を酵素的に除去する工程を含む。そして、好ましくは、アルカリホスファターゼを用いて試料中のグルコース-6-リン酸をグルコースへ酵素的に変換する工程を含む(クリーニング反応)。

【0046】

本発明のクリーニング反応は、cAMPより遙かに高濃度であり、除去しなければ実質的にブランクを高めるおそれのある全ての試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPを除去することができる。グルコース-6-リン酸は後に検出反応で生成するので、試料中のグルコース-6-リン酸をあらかじめ酵素的に除去しておくことは、本測定方法の精度を向上させるので好ましい。これらのクリーニン

グ反応は、検出感度の向上のために重要である。

【0047】

しかも本発明では、従来クリーニング反応に用いられていた4種類の酵素(アピラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼ)のうち、5'-ヌクレオチダーゼの使用を取りやめることにより、反応時間が著しく短縮された。すなわち、約1時間を要していた反応時間が僅か5分乃至10分間程度に著しく短縮できることを見出した。

【0048】

ステップ1-クリーニングオプション反応1

(フルクトース-6-リン酸の除去)

また、同様にサイクル反応および検出反応で生成するフルクトース-6-リン酸もアルカリホスファターゼで加水分解し、除去しておくのが好ましい。

【0049】

ステップ1-クリーニングオプション反応2

(試料中の内因性グリコーゲンの除去)

さらに好ましくは、グルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼを用いて、グルコース-6-リン酸に変換される試料中の内因性グリコーゲンを除去する(オプション反応)。これにより、ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)において既知量のグリコーゲンを添加する際の妨害物質となる内因性グリコーゲンが消失する。

【0050】

ステップ2-変換反応(AMP化)

次に、クリーニング反応後の試料にホスホジエステラーゼを作用させ、cAMPをAMPに変換する(変換反応)。

【0051】

ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)

上記変換反応後、グリコーゲンおよび無機リン酸を添加し、AMPがグリコーゲンホスホリラーゼを活性化してグリコーゲンからグルコース-1-リン酸を生成する程度を指標として、AMPを定量する。即ち、グルコース-1-リン酸は、ホ

スホグルコムターゼによりグルコース-6-リン酸に変換され、グルコース-6-リン酸は最終的に6-ホスホグルコノラクトン、NADPH及び $H^+$ に酵素的に変換される。最後に、NADPH濃度を例えばTrusらの方法 [M.Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い、蛍光定量法を用いて測定する。

## 【0052】

ステップ3-検出オプション反応1(6-ホスホグルコノラクトンの分解)

また、6-ホスホグルコノラクトンは、水性溶媒中、in vitroで加熱して6-ホスホグルコン酸に変換することができ、さらに6-ホスホグルコン酸は、NADP<sup>+</sup>の存在下でin vitroでNADPH、およびリブローズ-5-リン酸に変換することができる。これにより、NADPHの濃度を高めることができる。このNADPH濃度を上記と同様に例えばTrusらの方法 [M.Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い、蛍光定量法を用いて測定する。

## 【0053】

ウサギ心臓から得られた同一試料に対する、刺激されたアデニル酸シクラーゼ活性を修正Salomon放射活性方法およびアルカリホスファターゼを用いない蛍光定量法の両方で測定したところ、測定結果は類似していた [A.Sugiyama et al., Anal.Biochem., 第218巻, 20頁(1994年); A.Sugiyama et al., Anal.Biochem., 第225巻, 368頁(1995年); A.Sugiyama et al., Yamanashi Med.J., 第10巻, 11頁(1995年)]。放射活性測定法と蛍光定量法から得られた結果を比較すると、絶対的な比活性は異なっているが、アデニル酸シクラーゼの刺激倍率は類似している。比活性の差異は恐らくアデニル酸シクラーゼ反応混合物における些細なファクターによるものと思われる。即ち、放射活性測定では試料中ホスホジエステラーゼによる [<sup>32</sup>P] cAMP分解を防ぐために非標識cAMPが使用され、一方、蛍光定量法では、新たに合成されるcAMPの試料中ホスホジエステラーゼによる分解を抑制するためにテオフィリンが使用されている。

## 【0054】

さらに、ステップ3-検出サイクル反応2で示したATP-ADPサイクル反応を使用したアデニル酸シクラーゼの測定によって、絶対的な比活性は放射活性および蛍光定量法の両方で同一であることが明らかになった。

## 【0055】

本発明の方法は、0.1mg未満の極微量の試料中の cAMP 量を測定することができ、そして 1fmol 未満の cAMP / 試料を測定することができる。また、本発明においては、生物学的試料に既知量の ATP を添加し、この ATP を試料中のアデニル酸シクラーゼの作用で cAMP に変換させ、次にクリーニング反応により内因性の ATP などのアデニンヌクレオチド類を全て除去した後、変換した cAMP 量を求めることによってアデニル酸シクラーゼ活性を算出することもできる。

## 【0056】

クリーニング反応において、アデノシンから生成したアンモニウムイオンは一連のクリーニング反応を本質的に完了させ、試料中のヌクレオチド類が再形成するのを妨げる。これらの操作により、これまでの蛍光定量アッセイからは予期できない顕著な改善効果が得られる。[Weign et al., Anal.Biochem., 第208巻, 217頁(1993年)]。

## 【0057】

## 【発明の実施の態様】

本発明の方法に従って定量される生物学的試料は、好ましくは哺乳動物由来のものであり、これには組織、血球、骨が含まれ、さらに尿、血液、髄液などの生物学的流体が含まれる。これらの試料は、新鮮なものであるか、または冷凍保存されていてもよい [Lowry et al., A Flexible System of Enzymatic Analysis, Harcourt Brace Jovanovich, New York(1972年)]。

## 【0058】

好ましい実施態様では本発明は次のような段階を含んでいる。

ステップ1-クリーニング反応(試料中の内因性非環状ヌクレオチド類

およびグルコース-6-リン酸の除去)

cAMP、グルコース-6-リン酸および少なくとも1種の非環状アデニンヌクレオチド類、即ちATP、ADP、AMPまたはこれらの混合物からなる群から選択されるものを含んでいる生物学的試料を、アピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼの混合物を含む水性緩衝液と混合して、非環



状アデニンヌクレオチド類(ATP、ADPおよび/またはAMP)およびグルコース-6-リン酸を酵素的に変換して除去する。

【0059】

「より迅速に」とは、従来約一時間を要していたクリーニング反応が約5～10分以内に、すなわち、 $1/12 \sim 1/6$ 、少なくとも $1/6$ の反応時間に短縮されることをいう。

【0060】

ステップ1-クリーニングオプション反応2

そして任意に、上記反応混合物をグルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼと混合して全ての試料中のグリコーゲンを分解、除去する。これにより、ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)において既知量のグリコーゲンを添加する際の妨害物質となる内因性グリコーゲンが消失する。このときcAMPは反応混合物中にそのまま保持される。

【0061】

ステップ2-変換反応(AMP化反応)

上記反応混合物をホスホジエステラーゼと混合して試料中のcAMPをAMPに変換する。

【0062】

ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)

さらに、グリコーゲンおよび無機リン酸の存在下でグリコーゲンホスホリラーゼと接触させてグルコース-1-リン酸を上記反応混合物中で生成させ、上記反応混合物中でホスホグルコムターゼと反応させ、グルコース-6-リン酸を生成させる。ついで、6-ホスホグルコノラクトン、NADPH及び $H^+$ に酵素的に変換し、上記反応混合物中のNADPH濃度を蛍光定量法で測定する。そして、このNADPHの濃度が上記試料中のアデニル酸シクラーゼ活性、cAMP量またはAMP濃度と相関する。

【0063】

このcAMPの測定法は、cAMPの3',5'-ホスホジエステル結合の開裂に

よって生成するAMPが、グリコーゲンホスホリラーゼ活性を刺激するという原理に基づいている。すなわち、cAMPおよびアデニル酸シクラーゼ活性の量はcAMPから生成したAMPがグリコーゲンホスホリラーゼを活性化し最終的に得られたNADPHの吸光度に対応する。

【0064】

NADPHの最終濃度とAMP濃度の相関関係は、例えば検量線によって求めることができる(図2参照)。

【0065】

好ましくは、上記ステップ1-クリーニング反応後に、加熱してクリーニング反応で使用した酵素を不活性化する。

【0066】

また好ましくは、上記ステップ1-クリーニング反応に続いて、ホスホジエステラーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼ、グルコース-1,6-二リン酸、無機リン酸、グリコーゲン、 $\text{NADP}^+$ 、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホグルコムターゼおよび $\text{Mg}^{2+}$ からなる液を反応混合物に添加し、上記変換反応および検出反応の工程をin vitroで連続的に実施する。

【0067】

ステップ3-検出オプション反応1(6-ホスホグルコノラクトンの分解)

任意に、ステップ3-検出反応1の反応混合物を加熱して6-ホスホグルコノラクトンを順次6-ホスホグルコン酸に変換し、その後、 $\text{Mg}^{2+}$ の存在下で $\text{NADP}^+$ および6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼと反応させ、上記で示されるように、リブロース-5-リン酸、NADPH、 $\text{H}^+$ および $\text{CO}_2$ として上記工程(4)で生成されるNADPHの濃度を高めることもできる。

【0068】

ステップ3-検出サイクル反応1

ステップ3-検出反応1で生成するNADPHの有効濃度は、これをサイクル反応系で使用するによって数オーダー増加させることができる。即ち、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の存在下でNADPHは $\text{NADP}^+$ およびグルタミン酸に変換される。 $\text{NADP}^+$ は順次、添加されたグルコース-6-リン酸を6-ホスホグルコノ

ラクトンおよびNADPHに変換する。上記したように、6-ホスホグルコノラクトンは加水分解され( $H_2O$ 、加熱)、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよび $Mg^{2+}$ の存在下でリブロース-5-リン酸およびNADPHに変換することができる [Lowry et al., A Flexible System of Enzymatic Analysis, Harcourt Brace Jovanovich, ニューヨーク(1972年)]。

## 【0069】

## ステップ2-変換オプション反応1(ATP化)

あるいは、cAMPから生成するAMPは、痕跡量のATPの存在下でミオキナーゼと混合することによりADPに変換することができる。次に生成したADPは2-ホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼで処理することにより、ATPとピルビン酸に変換される。この反応により、1分子のAMPから1分子のATPが生成する(ATP化反応)。

## 【0070】

上記のcAMPからAMP、ADPを経由してATPへ至る、ステップ2-変換反応およびステップ2-変換オプション反応1は、1段階で行うことができる。

## 【0071】

## ステップ3-検出反応2(NADPHの蛍光光度測定)

さらにATPは、まずフルクトースの存在下でヘキソキナーゼで処理されフルクトース-6-リン酸およびADPに変換される。生成したフルクトース-6-リン酸はホスホグルコイソメラーゼの作用によりグルコース-6-リン酸に変換され、最終的に6-ホスホグルコノラクトン、NADPH及び $H^+$ に酵素的に変換される。そして、同様に、NADPH濃度をTrusらの方法 [M.Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い測定する。

## 【0072】

## ステップ3-検出オプション反応1

さらに同様に、6-ホスホグルコノラクトンを加水分解して6-ホスホグルコン酸に更に変換し、この6-ホスホグルコン酸を $NADP^+$ の存在下で、NADPH、 $H^+$ 、 $CO_2$ およびリブロース-5-リン酸に変換してもよい。

【0073】

ステップ3-検出サイクル反応2(ATP-ADPサイクル反応による増幅)

そしてさらにATPは、ATP-ADPサイクル反応に供される。即ち、ATPは、まずフルクトースの存在下でヘキソキナーゼで処理されフルクトース-6-リン酸およびADPに変換される。次にこのADPは、ホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼの作用によりATPおよびピルビン酸となる。ここで生成したATPは再びフルクトース-6-リン酸およびADPに変換される。この反応が繰り返されることにより、最終的にフルクトース-6-リン酸が蓄積する。

【0074】

サイクル反応終了時の酵素の不活性化のために、キレート剤を添加する。キレート剤はEDTAのようなポリアミノカルボン酸、クエン酸のようなオキシカルボン酸などが用いられる。好ましくは、EDTAである。

【0075】

サイクル反応では、過剰のフルクトースおよびホスホエノールピルビン酸から得られるフルクトース-6-リン酸は、ホスホグルコースイソメラーゼによりグルコース-6-リン酸に変換される。このグルコース-6-リン酸をグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび $\text{NADP}^+$ で処理することによって6-ホスホグルコノラクトンおよび $\text{NADPH}$ に変換される。そして、 $\text{NADPH}$ 濃度をTrusらの方法[M.Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)]に従い、測定する(ステップ3-検出反応2参照)。

【0076】

ステップ3-検出反応3

さらに、本発明においては、上記ステップ2-変換オプション反応1のATP化反応で生成したATPをルシフェラーゼ反応またはホタルルシフェリンを使用する化学的蛍光分析法を用いて吸光度測定によって検出してもよい[Wulff et al., Methods of Enzymatic Analysis, H.U.Bergmeyer編集, VCH(1985年)]。ATPの測定値から、AMPおよびcAMP濃度ならびにそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性を算出することができる。

【0077】

この反応の進行は非常に緩慢であるが、反応収率(発光した光子数と変換されたATP分子数の比率として定義される)はほぼ100%である。発光強度はATP濃度と正比例し、582nmで測定される。

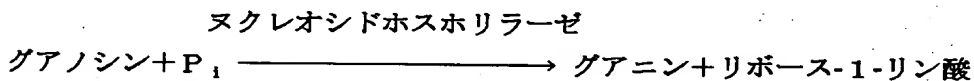
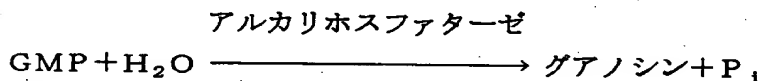
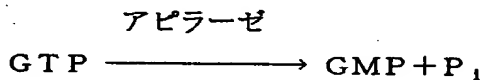
【0078】

本発明の測定法は、反応系の概念が同一であれば、AMP以外の物質に適用することができる。例えば、GMPに対応する酵素を適応することにより、グアニル酸シクラーゼ活性やサイクリックグアノシン-3',5'-リン酸(cGMP)およびグアノシン-3',5'-リン酸(GMP)の定量に用いることもできる。用いられる反応式を下記に示す。

【0079】

ステップ(i)-クリーニング反応

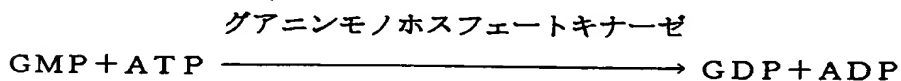
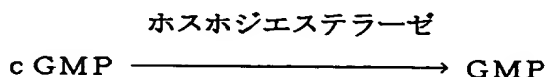
【化17】



【0080】

ステップ(ii)-変換反応

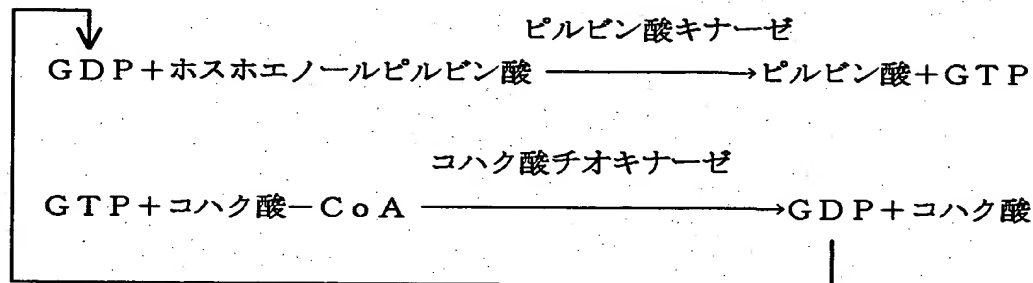
【化18】



【0081】

ステップ(iii)－サイクル反応

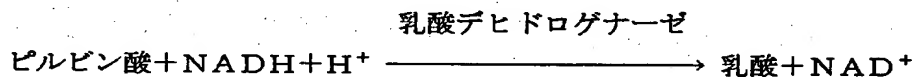
【化19】



【0082】

ステップ(iv)－検出反応

【化20】



【0083】

ステップ(i)－クリーニング反応

即ち、上記式に示したように、アピラーゼ、アルカリホスファターゼ、ヌクレオシドホスホリラーゼおよびグアナーゼからなるクリーニング混合物が使用される。アルカリホスファターゼは、cGMPの測定中にブランク値を高める可能性のある化合物、例えばグルコース-6-リン酸や非環状ヌクレオチドを脱リン酸化にも用いられ得る(クリーニング反応)。

【0084】

クリーニング反応では、試料中GTPはGMP + 2P<sub>i</sub>に変換された後、グアノシンとP<sub>i</sub>に変換される。グアノシンはグアニンとリボース-1-リン酸に変換され、そしてグアニンは、キサンチンとアンモニアに変換される。cAMPの測定におけるクリーニング反応と同様に、最終クリーニング反応におけるアンモニ

ウム(または $\text{NH}_4^+$ )は、一連のクリーニング反応を本質的に終了させ、その結果、干渉ヌクレオチドを確実に除去する。

【0085】

好ましくは、クリーニング反応で使用される酵素は次のステップ(ii)-変換反応の前に、例えば加熱によって不活化される。

【0086】

ステップ(ii)-変換反応

次に、ホスホジエステラーゼを用いて試料中に存在するcGMPをGMPに変換する。GMPをグアニンモノホスフェートキナーゼの存在下でATPと混合するとグアノシン-5'-二リン酸(GDP)とADPが得られる。

【0087】

ステップ(iii)-サイクル反応

GDPは、過剰のホスホエノールピルビン酸、スクシニル-CoAおよび無機リン酸( $\text{P}_i$ )の存在下で一定量のピルビン酸を生じる(サイクル反応)。

【0088】

ステップ(iv)-検出反応

このピルビン酸は、酸の存在下で乳酸および $\text{NAD}^+$ に変換される既知量のNADHを添加して間接的に定量される。かくして、インジケータ試料の蛍光は、cGMP、GMP又はグアニル酸シクラーゼについてアッセイされる試料中で生成するピルベートの量に正比例して減少する。

【0089】

本発明では、ステップ(ii)-変換反応において、グアニンモノホスフェートキナーゼによって分解するATP量を測定して、GMP量を求めることもできる。ATPは上記で示したような、公知の方法で測定することができる。

【0090】

本発明の酵素的手法を用いたアデニル酸シクラーゼ活性またはグアニル酸シクラーゼ活性の測定は、高感度であり、費用も顕著に安く、また短時間で結果を得ることができる。さらに放射性物質を使用しないので、オペレーターにとって安全であり、そして環境に対しても良好である。

## 【0091】

最後に、本発明の測定方法は、生物学的試料中または外来性のホスホジエステラーゼの量を測定するように適合させることも容易である。即ち、cAMPの予め選択された単一量を未知濃度のホスホジエステラーゼを含有する試料に添加する。この時、ホスホジエステラーゼに対する特異的なインヒビターを必要に応じて添加してもよい。cAMPの予め選択された単一の過剰量を種々の予め選択された既知量のホスホジエステラーゼに添加することによって標準曲線が得られる。添加されたcAMPの幾らかがホスホジエステラーゼによってAMPに転換される反応時間(5~60分)後に、反応を停止させる。cAMP標準曲線を同時に実施して反応が適切に進行していることを証明することができる。クリーニング反応を開始して、非環状アデニンヌクレオチドをすべて分解する。残存cAMPは天然+添加ホスホジエステラーゼに反比例する。次に、cAMPを通常の方法でAMPに変換し、測定する。

## 【0092】

具体的には、試料組織をSET緩衝液(0.5MのNaCl、0.03Mのトリス、2mMのEDTA)に溶解し、2倍量のPDE混合物(50mMのトリス、50 $\mu$ MのcAMP)を添加し、37℃で20分間インキュベーションする。この反応混合物を80℃で30分間加熱する。組織に対して4倍量のクリーニング反応混合物を添加し、37℃で1時間インキュベーションする。この反応混合物を80℃で30分間加熱する。次に組織に対して10倍量の変換反応混合物を添加し、室温で1時間インキュベーションした後、検出反応により、NADPHの蛍光強度を測定する。

## 【0093】

本発明においては、使用する酵素や緩衝液等が予めキット化された製剤として提供される。この場合、クリーニング反応混合物キット、変換反応混合物キット、サイクル反応混合物キット、検出反応混合物キットのように、各反応工程毎にキット化すると便利である。

## 【0094】

本発明に使用する酵素等は、適当なガラス製またはプラスチック製容器のバイ



アル、アンプルに、例えば液剤、凍結乾燥剤または固形剤の形状で充填され、提供される。

【0095】

酵素類は予め緩衝液、電解質液、蒸留水等で溶解されていてもよい。あるいは、複室容器に酵素と溶解液を別々に収容しておき、使用直前に混合してもよい。

【0096】

また、適宜、保存剤、安定化剤、着色剤、賦形剤、pH調整剤などの添加物を加えることもできる。

【0097】

本発明の測定方法は、本明細書に記載した増幅反応を使用する他、適当な自動分析装置を用いて行ってもよい。

【0098】

【発明の効果】

本発明は、アデニル酸シクラーゼ活性およびcAMP並びにcAMP特異的ホスホジエステラーゼ活性およびG調節タンパク質の生物学的活性に関する非放射性的酵素的蛍光定量法を提供する。また、本発明は、グアニル酸シクラーゼ活性およびcGMPの非放射的測定を提供する。

【0099】

本発明の方法は、現在利用されているアデニル酸シクラーゼ活性等の測定方法に比べて幾つかの利点を有する。即ち、本発明は、Y.Salomonらによって開示された従来法[Anal.Biochem., 第58巻, 541頁(1974年); Adv.Cyclic Nucleotide Res., 第10巻, 35頁(1979年)]と異なり、放射性物質を一切使用しない。加えて、本発明の測定方法は、従来法に比べ高感度で、操作がより簡単である。

【0100】

さらに、本発明者らが先に開発した酵素反応を用いた測定方法[A.Sugiyama et al., Anal.Biochem., 第218巻, 20頁(1994年); A.Sugiyama et al., J.Clin.Lab., 第8巻, 437頁(1994年); A.Sugiyama et al., Anal.Biochem., 第225巻, 368頁(1995年); A.Sugiyama et al., Yamanashi Med.J., 第10巻, 11頁(1995年)]と比較しても、反応時間が著しく短縮され、操作もより簡便なものとなっている

。また、従来方法では回避できなかった試料の白濁化をEDTAなどのキレート剤を用いることで解決した。そして、この方法を用いることで、 $\mu\text{g}$ オーダーの生物学的試料中のcAMP量をpmolまたはfmolレベルで正確に定量することが可能である。

#### 【0101】

本発明のクリーニング反応は、cAMPより遙かに高濃度であり、除去しなければ実質的にブランクを高めるおそれのある全ての試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPを除去することができる。さらに、同様に妨害物質として作用する試料中のグルコース-6-リン酸およびグリコーゲンも全て除去することができる。これらのクリーニング反応は、検出感度の向上のために重要である。

#### 【0102】

しかも本発明では、従来クリーニング反応に用いられていた4種類の酵素(アピラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼ)のうち、5'-ヌクレオチダーゼの使用を取りやめることにより、1時間を要していた反応時間が僅か5分乃至10分間程度に著しく短縮できることを見出した。

#### 【0103】

また、サイクル反応後、キレート剤により $\text{Mg}^{2+}$ をトラップするので、加熱することなく過剰の酵素が不活性化することができ、試料が白濁しない。

#### 【0104】

本発明の測定方法の感度は、反応容量を減少させることによって高めることもできる。この感度は、Meinrich等またはE.Helmrich等 [E.Helmrich et al., Biochemistry, 第52巻, 647頁(1964年)] の方法を用いることにより、反応混合物中のグリコーゲンおよび無機リン酸の濃度を変えることによって更に高めることもできる。本発明は、 $10\mu\text{g}$ 程度の微量の哺乳動物組織の膜タンパク質中のアデニル酸シクラーゼ活性を測定することが可能である。

#### 【0105】

従来の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  cAMPの比活性およびクロマトグラフィー分離などの容量サイズによって感度が制限される放射活性測定方法とは異なって、本発明の蛍

光定量方法においては、感度を高めることに対して顕著な障害は存在していない。例えば、cAMPは広範な濃度範囲(1 fmol~1 mmol)で測定可能である。

## 【0106】

## 【実施例】

本発明は、以下の実施例により更に詳細に説明される。これらの実施例においては使用した酵素、基質およびコファクターは、Boehringer Mannheim社から入手した。ただし、アピラーゼおよび5'-ヌクレオチダーゼはSigma社から入手した。[ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP、 $^3$ H-cAMPおよびアクアソルシンチレーションカクテルはNew England Nuclear社から購入した。Neutral Chromatographic Alumina WN-3はBio-Rad社製を用いた。

## 【0107】

## 実施例1 クリーニング反応時間の設定

3  $\mu$ LのATP標準品(0、10、100、1000および10000 pmol/tube)を10 $\times$ 57のPyrex(商品名)製分析管に加えた。室温にて、クリーニング反応混合物(100 mMのトリス-HCl、pH 8.0; 2 mMのMgCl<sub>2</sub>; 2 U/mLのアピラーゼ; 10 U/mLのアデノシンデアミナーゼ; 40 U/mLのアルカリホスファターゼ)25  $\mu$ Lを各分析管に加えた。この混合物を37℃でインキュベートした(0、5、10、15および20分間)。以下、ステップ2-変換反応(AMP化反応)および変換オプション反応(ATP化反応)、ステップ3-検出サイクル反応2を行い、340nmにおける吸光度を測定し、ATPが完全に消失するインキュベーション時間を求めた。結果を図1に示す。その結果、少なくとも10分間のインキュベーションで妨害物質のATPはほぼ消失することが判った。

## 【0108】

## 比較実験

本願発明のクリーニング反応と5'-ヌクレオチダーゼを用いたクリーニング反応とを比較するために行われた。

## 5'-ヌクレオチダーゼを含むクリーニング反応混合物の調製

トリス-HCl (pH 8.0)、MgCl<sub>2</sub>、5'-ヌクレオチダーゼ、アピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼに水を加えて全量

25  $\mu$ Lとし、表1に示す最終濃度を有するクリーニング反応混合物を調製した。

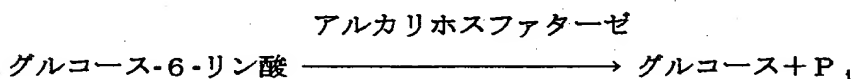
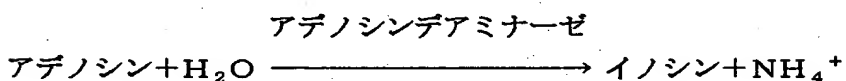
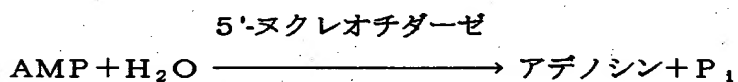
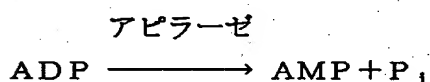
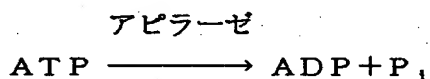
表1：クリーニング反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH 8.0)	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
5'-ヌクレオチダーゼ	2.5 U/mL
アピラーゼ	2 U/mL
アデノシンデアミナーゼ	0.1 U/mL
アルカリホスファターゼ	20 U/mL
H <sub>2</sub> O	-

【0109】

このクリーニング反応は以下の式で示すことができる。

【化21】



【0110】

クリーニング反応時間の設定

上記で調製したクリーニング反応混合物を用い、実施例1の方法に準じてクリーニング反応を行った。

3  $\mu$ L の ATP 標準品 (0、10、100、1000 および 10000 pmol/tube) を 10  $\times$  57 の Pyrex 製分析管に加えた。室温にて、上記で調製したクリーニング反応混合物 (100 mM の トリス-HCl (pH 8.0) ; 2 mM の MgCl<sub>2</sub> ; 2 U/mL の アピラーゼ ; 2.5 U/mL の 5'-ヌクレオチダーゼ ; 0.1 U/mL の アデノシンデアミナーゼ ; 20 U/mL の アルカリホスファターゼ) 25  $\mu$ L を各分析管に加えた。この混合物を 37℃ で インキュベートした。以下、実施例 2 に記載の変換反応、サイクル化反応および検出反応を行い、340 nm における吸光度を測定し、ATP が完全に消失するインキュベーション時間を求めた。その結果、ATP を完全に消失させるためには、およそ 1 時間を要した。

#### 【0111】

実施例 2 組織培養物における酵素的蛍光定量による微量 cAMP 測定

##### (1) 試料および反応混合物の調製

##### A. 生物学的試料の調製 (心室筋細胞の調製)

初代培養で増殖させた 1 日齢のラットの心臓から心室筋細胞を採取した。心臓あたり約 500 万個の心筋細胞が生存していた。100mm あたり約 100 万個の細胞密度で播いた後、皿細胞を 5% ウシ血清細胞を含有するハンクスの平衡塩類溶液を有する最少必須培地中で増殖させた [Simpson et al., Cir.Res., 第 51 巻, 787 頁 (1982 年)]。4 日目に培地を交換した。培養物は 90% 以上の心筋細胞を含有しており、細胞数は期間中一定であった [Simpson et al., Cir.Res., 第 51 巻, 787 頁 (1982 年) ; Rocha-Singh et al., J.Clin.Invest., 第 88 巻, 204 頁 (1991 年) ; Rocha-Singh et al., J.Clin.Invest., 第 88 巻, 706 頁 (1991 年)]。

6 プレートの筋細胞を 2 群 (n = 3 プレート/群) に無作為抽出した。ホスホジエステラーゼインヒビター、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) を各群の培地に 2  $\mu$ M の最終濃度となるように添加した。5 分後、一方の群にイソプロテレノールを 1  $\mu$ M の最終濃度となるように添加し、刺激群とした。他方の群には追加的な薬品を加えなかった。5 分後、6 つの全プレートの細胞および細胞なしの培養培地プレートを合計 5 mL の 100% エタノールで溶出した。各皿から得られる溶出物の 10 分の 1 (0.5 mL) を採り、12  $\times$  75 mm のハウケイ酸ガラス管中で

風乾し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。残りの $4.5\text{mL}$ も同様に風乾し、貯蔵した。測定時に、ペレットを解凍し、 $0.5\text{N}$ の過塩素酸 $100\mu\text{L}$ に再度懸濁した。抽出物を $4^{\circ}\text{C}$ で2分間攪拌し、超音波処理器(Branson Cleaning Equipment社、A Smith-Kline社、米国)を使用して1分間超音波処理した。抽出物を $25\mu\text{L}$ の $2\text{N KOH}$ で中和し、 $2000\text{g}$ で30分間遠心した後、上清液 $80\mu\text{L}$ を分析用に採取した。

【0112】

B. クリーニング反応混合物の調製(ステップ1クリーニング反応参照)

$1\text{M}$ のトリス- $\text{HCl}$  ( $\text{pH}8.0$ )  $400\mu\text{L}$ 、 $0.2\text{M}$ の $\text{MgCl}_2$   $40\mu\text{L}$ 、 $500\text{U/mL}$ のアピラーゼ $32\mu\text{L}$ 、 $400\text{U/mL}$ のアデノシンデアミナーゼ $100\mu\text{L}$ および $4000\text{U/mL}$ のアルカリホスファターゼ $40\mu\text{L}$ に水を加えて全量 $4\text{mL}$ とし、クリーニング反応混合物を調製した(表2)。

【0113】

表2：クリーニング反応混合物

化合物	最終濃度
トリス- $\text{HCl}$ ( $\text{pH}8.0$ )	$100\text{mM}$
$\text{MgCl}_2$	$2\text{mM}$
アピラーゼ	$4\text{U/mL}$
アデノシンデアミナーゼ	$100\text{U/mL}$
アルカリホスファターゼ	$40\text{U/mL}$
$\text{H}_2\text{O}$	—

【0114】

実施例2(1)で調製したラット心室筋細胞調製物を氷冷した後、 $0.4\mu\text{L}$ のステップ1-クリーニングオプション反応混合物( $100\text{mM}$ トリス- $\text{HCl}$  ( $\text{pH}8.0$ )、 $3\text{mM}$ の $\text{MgCl}_2$ 、 $3\text{U/mL}$ のアピラーゼ、 $150\mu\text{g/mL}$ のアデノシンデアミナーゼ、 $30\text{U/mL}$ のアルカリホスファターゼ、および $75\mu\text{g/mL}$ のグリコーゲンホスホリラーゼ- $\alpha$ )を加えて、すべての内因性アデニンヌクレオチド、グリコーゲン、およびグルコース-6-リン酸を除去した。 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベーションした後、 $80^{\circ}\text{C}$ で30分間加熱して、酵素を不活性化した。

## 【0115】

C. 変換反応混合物の調製(ステップ2-変換反応およびステップ2-変換オプション反応参照)

1Mのトリス-HCl (pH8.0) 400  $\mu$ L、0.2MのMgCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ L、4%のウシ血清アルブミン10  $\mu$ L、1MのKCl 600  $\mu$ L、0.1Mのジチオトレイトール80  $\mu$ L、0.1  $\mu$ MのATP 16  $\mu$ L、0.5Mのホスホエノールピルビン酸24  $\mu$ L、2 U/mLのホスホジエステラーゼ24  $\mu$ L、720 U/mLのミオキナーゼ24  $\mu$ Lおよび2000 U/mLのピルビン酸キナーゼ160  $\mu$ Lに水を加えて全量4 mLとし、変換反応混合物を調製した(表3)。

## 【0116】

表3：変換反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
ウシ血清アルブミン	0.01%
KCl	150mM
ジチオトレイトール	2mM
ATP	40nM
ホスホエノールピルビン酸	3mM
ホスホジエステラーゼ	12mU/mL
ミオキナーゼ	4.5U/mL
ピルビン酸キナーゼ	80U/mL
H <sub>2</sub> O	—

## 【0117】

D. サイクル反応混合物の調製(ステップ3-検出サイクル反応2)

1Mのトリス-HCl (pH8.0) 400  $\mu$ L、0.2MのMgCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ L、4%のウシ血清アルブミン10  $\mu$ L、0.1Mのフルクトース30  $\mu$ Lおよび1500 U/mLのヘキソキナーゼに水を加えて全量4 mLとし、サイクル反応混合物を調製した(表4)。

## 【0118】

表4：サイクル反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
ウシ血清アルブミン	0.01%
フルクトース	3mM
ヘキソキナーゼ	60mM
H <sub>2</sub> O	—

【0119】

## E. 検出反応混合物の調製(ステップ3-検出反応2参照)

1Mのトリス-HCl (pH8.0) 2000  $\mu$ L、0.2MのEDTA 320  $\mu$ L、0.1MのNADP<sup>+</sup> 120  $\mu$ L、3500U/mLのホスホグルコイソメラーゼ 6  $\mu$ Lおよび1750U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ 6  $\mu$ Lに水を加えて全量4mLとし、検出反応サイクルを調製した(表5)。

【0120】

表5：検出反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
EDTA	3.2mM
NADP <sup>+</sup>	0.01%
ホスホグルコイソメラーゼフルクトース	1U/mL
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	0.5U/mL
H <sub>2</sub> O	—

【0121】

## (2) 組織培養物における酵素的蛍光定量による微量cAMP測定

Aで調製した心室筋細胞調製物を試料とし、クリーニング反応、変換反応、サイクル反応および検出反応からなる一連の酵素的蛍光定量法によりcAMPを求めた。

【0122】



## 1) クリーニング反応(ステップ1-クリーニング反応)

中和した  $3 \mu\text{L}$  容量の筋細胞抽出物(100mmプレートから得られる総溶出物の2.4%または0.24%のいずれか)または  $3 \mu\text{L}$  の cAMP 標準品(0、3.6、7.2、14.4、21.6および28.8pmol/ $20 \mu\text{L}$ )を10×57のPyrex<sup>®</sup>製分析管(岩城硝子製)に加えた。室温にて、Bで調製した  $25 \mu\text{L}$  のクリーニング反応混合物(100mMのトリス-HCl (pH8.0); 2mMの $\text{MgCl}_2$ ; 2U/mLのアピラーゼ; 10U/mLのアデノシンデアミナーゼ; 40U/mLのアルカリホスファターゼ)を各分析管に加えた。この混合物を37℃で10分間インキュベートした。次に、90℃で30分間加熱して酵素を不活化した。同様に内部組織ブランクを調製した。

## 【0123】

## 2) 変換反応(ステップ2-変換反応(AMP化反応)および

## -変換オプション反応(ATP化反応))

クリーニング反応の各分析管に、Cで調製した変換反応混合物(100mMのトリス-HCl (pH8.0); 2mMの $\text{MgCl}_2$ ; 0.01%のウシ血清アルブミン; 150mMのKCl; 2mMのジチオトレイトール; 40nMのATP; 3mMのホスホエノールピルビン酸; 12mU/mLのホスホジエステラーゼ; 4.5U/mLのミオキナーゼ; 80U/mLのピルビン酸キナーゼ)  $25 \mu\text{L}$  を添加した。室温で一晩インキュベーションした。分析管を90℃で5分間加熱して反応を終了させた。

## 【0124】

## 3) サイクル反応(ステップ3-検出サイクル反応2)

変換反応の各分析管に、Dで調製したサイクル反応混合物(100mMのトリス-HCl (pH8.0); 2mMの $\text{MgCl}_2$ ; 0.01%のウシ血清アルブミン; 3mMのフルクトース; 60U/mLのヘキソキナーゼ)  $25 \mu\text{L}$  を添加した。反応当たりの酵素濃度が高いことを考慮して、これらの反応物を0℃にセットして全てのアッセイ管の開始時間を確実に同一にすることが重要であった。37℃で2時間インキュベート(およそ4000~10000サイクル)した。

## 【0125】

## 4) 検出反応(ステップ3-検出反応2)

サイクル反応の各分析管に、Eで調製した検出反応混合物(100mMのトリス-H

C1、pH8.0; 3.2mMのEDTA; 0.6mMのNADP<sup>+</sup>; 1U/mLのホスホグルコイソメラーゼ; 0.5U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)125 $\mu$ Lを添加した。室温で20分間反応後、フルオロメーター(Optical Technology Devices社、ニューヨーク)を使用してNADPHの最終濃度を測定した。フルオロメーターは、10蛍光単位の読み取りが緩衝液(50mMのトリス-HCl、pH8.0)900 $\mu$ L中1nmolのNADPHと等価になるようにセットした。

なお、個々の分析過程は、既知濃度の適当な基質を使用する内部対照を同時に分析することにより確認した(例えば、クリーニング反応をチェックするためにATPを追加して使用し、変換反応を評価するためにAMP標準直線を使用し、サイクル反応を評価するためにはATP標準直線を使用した)。

【0126】

#### 5)測定結果

340nmでの蛍光測定によってcAMP標準品(0、3.6、7.2、14.4、21.6および28.8pmol/20 $\mu$ L)から図2に示される標準cAMP直線が得られた。

【0127】

また、(1)のAで調製した試料について、追加的な薬剤を加えなかった対照群およびイソプロテレノール刺激群中のcAMP含量を、各試料のプレートの1/10の溶離液に関し、得られた標準cAMP直線(図2)を用いて測定し、cAMP 680pmol/100mmプレートの実測値を得た。

【0128】

本発明の方法、免疫比色キット(アマシャム・インターナショナル製)および放射免疫測定キット(アマシャム・インターナショナル製)を用いて測定した結果を図3に示す。cAMP含量の測定結果は、公知の方法の放射活性測定法により得られた結果とよく一致しており、その差は通常の5%以下であった。

【0129】

さらに、cAMPの定量結果からアデニル酸シクラーゼ活性を、本発明の方法、放射免疫測定法、およびSalomon法により求めた。その結果を図4に示す。アデニル酸シクラーゼ活性は、1分間あたりのタンパク質1mgにおけるcAMPの生成量(pmol)で示した。

## 【0130】

## 実施例 2

1Mのトリス-HCl (pH8.0)、0.2MのMgCl<sub>2</sub>、1MのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1MのAMP、4000U/mLのアルカリホスファターゼ、および10mg/mLのグリコーゲンホスホリラーゼの適量を取り、水を加えて最終濃度が以下になるように、クリーニング反応混合液を調製した。

## クリーニング反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5mM
AMP	0.1mM
アルカリホスファターゼ	20U/mL
グリコーゲンホスホリラーゼ	10μg/mL
H <sub>2</sub> O	—

## 【0131】

1Mのトリス-HCl (pH8.0)、0.1MのMgCl<sub>2</sub>、1MのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1MのAMP、0.1Mのジチオトレイトール、1mMのグルコース-1, 6-ニリン酸、4%のウシ血清アルブミン、0.1MのNADP、10mg/mLのグリコーゲンホスホリラーゼ、10mg/mLのホスホグルコムターゼ、および5mg/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの適量を取り、水を加えて最終濃度が以下となるように、変換反応混合物を調製した。

## 変換反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5mM

AMP	0.1mM
ジチオトレイトール	1mM
グルコース-1, 6-ニリン酸	4 $\mu$ M
ウシ血清アルブミン	0.01%
NADP	0.2mM
グリコーゲンホスホリラーゼ	20 $\mu$ g/mL
ホスホグルコムターゼ	4 $\mu$ g/mL
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	2 $\mu$ g/mL
H <sub>2</sub> O	—

## 【0132】

## 1) クリーニング反応 (ステップ1-クリーニングオプション反応2)

206  $\mu$ Mのグリコーゲンを含有するグリコーゲン溶液を調製し、12本のPyrex製分析管 (岩城硝子製: 10×57mm) に分注し (0、20、40および80  $\mu$ Lを各3本)、蒸留水を加えて全量を80  $\mu$ Lとした。室温にて、500  $\mu$ Lのクリーニング反応混合液 (100mMのトリス-HCl (pH8.0); 2mMのMgCl<sub>2</sub>; 5mMのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.1mMのAMP; 20U/mLのアルカリホスファターゼ; 10  $\mu$ g/mLのグリコーゲンホスホリラーゼ) を各分析管に加えた。この混合物を37℃で60分間インキュベートした。

## 【0133】

## 2) 検出反応 (ステップ3-検出反応1)

クリーニング反応の各分析管に、変換反応混合物 (100mMのトリス-HCl (pH8.0); 2mMのMgCl<sub>2</sub>; 5mMのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.1mMのAMP; 1mMのジチオトレイトール; 4  $\mu$ Mのグルコース-1, 6-ニリン酸; 0.01%のウシ血清アルブミン; 0.2mMのNADP; 20  $\mu$ g/mLのグリコーゲンホスホリラーゼ; 4  $\mu$ g/mLのホスホグルコムターゼ; 2  $\mu$ g/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) 500  $\mu$ Lを添加した。37℃で30分間インキュベーションした。各分析管につき励起波長340nmにおける460nmの蛍光波長を測定した。その結果、グリコーゲン溶液中のグリコーゲンがすべてクリーニング反応により消失していることを確認した。

【0134】

実施例4 キレート剤による白濁防止効果

実施例2のサイクル反応後の分析管に、EDTAを含まない検出反応混合物(100mMのトリス-HCl、pH8.0; 0.6mMの $\text{NADP}^+$ ; 1U/mLのホスホグルコイソメラーゼ; 0.5U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)125 $\mu\text{L}$ を添加し、90℃で30分間加熱し、酵素を失活させた。試料液の白濁の程度を目視観察した。また、実施例2で得られた検出反応混合物添加溶液(EDTA-室温で酵素を失活させたもの)を対照とした。

その結果、加熱失活の場合は試料溶液が白濁したのに対し、EDTAを用いた場合は、試料溶液は澄清であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 cAMPの標準試料の濃度に対する蛍光光度測定値を示すグラフである。

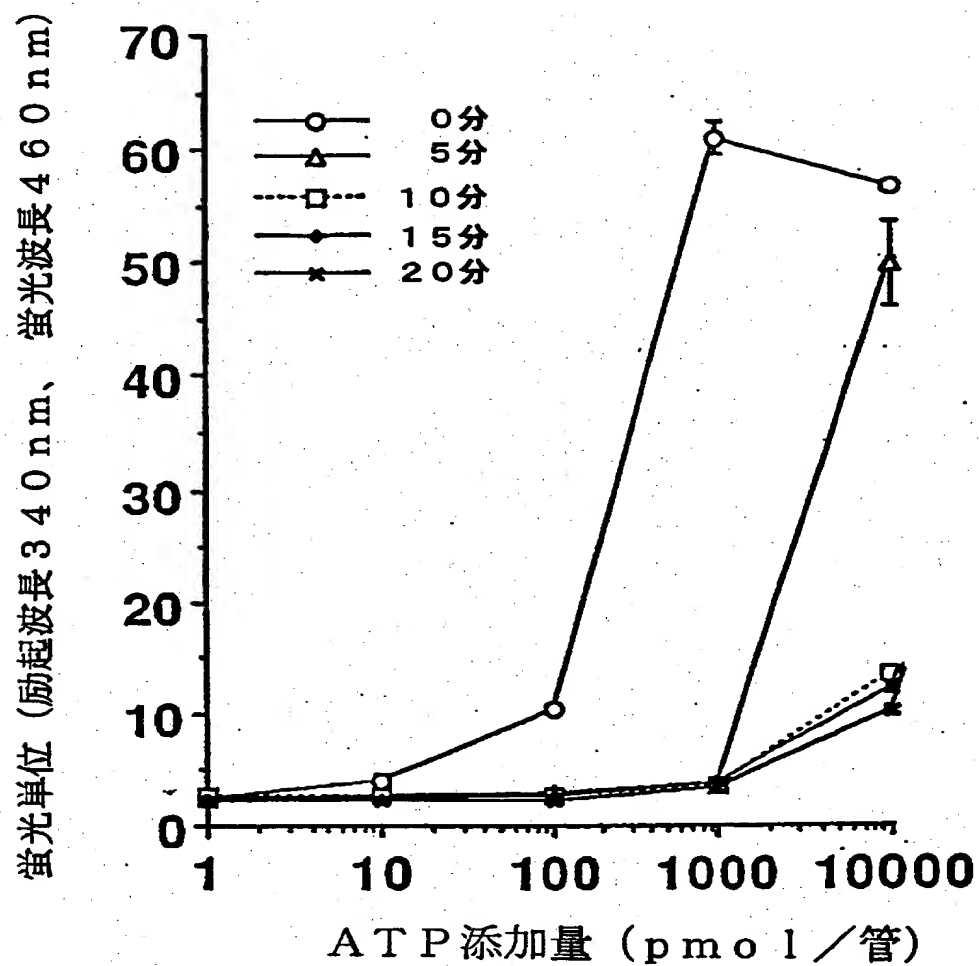
【図2】 ATPの標準試料におけるインキュベーション時間に対する蛍光光度測定値を示すグラフである。

【図3】 本発明の方法、免疫比色法および放射免疫測定法を用いてcAMP値を比較測定した結果を示す棒グラフである。

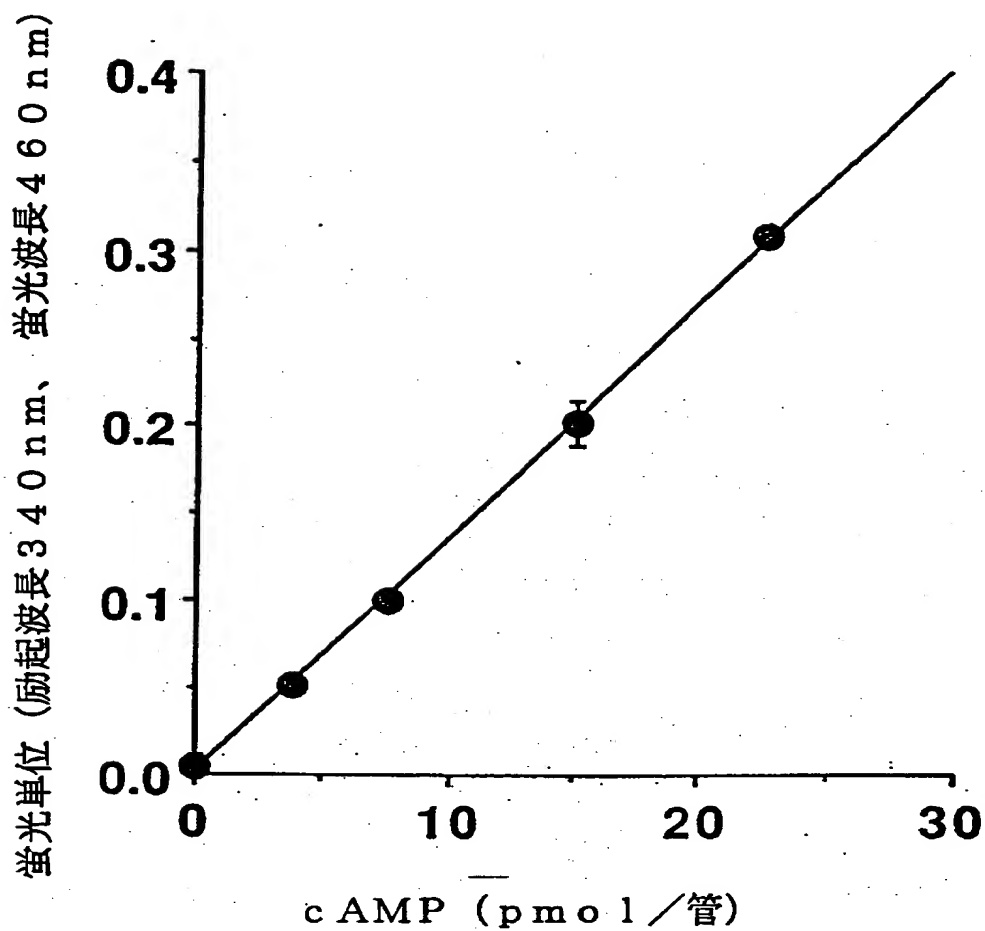
【図4】 本発明の方法、放射免疫測定法およびSalomon法を用いてアデニル酸シクラーゼ活性を比較測定した結果を示す棒グラフである。

【書類名】 図面

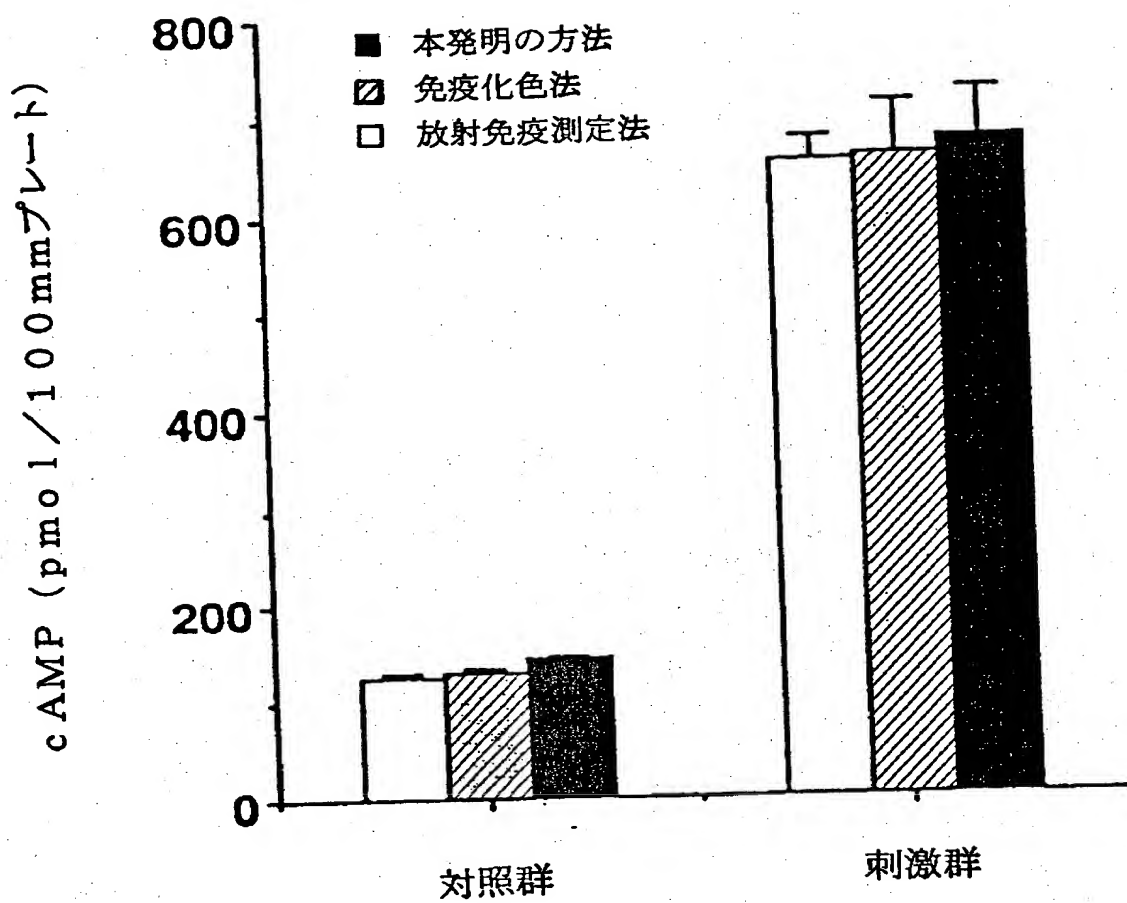
【図1】



【図2】

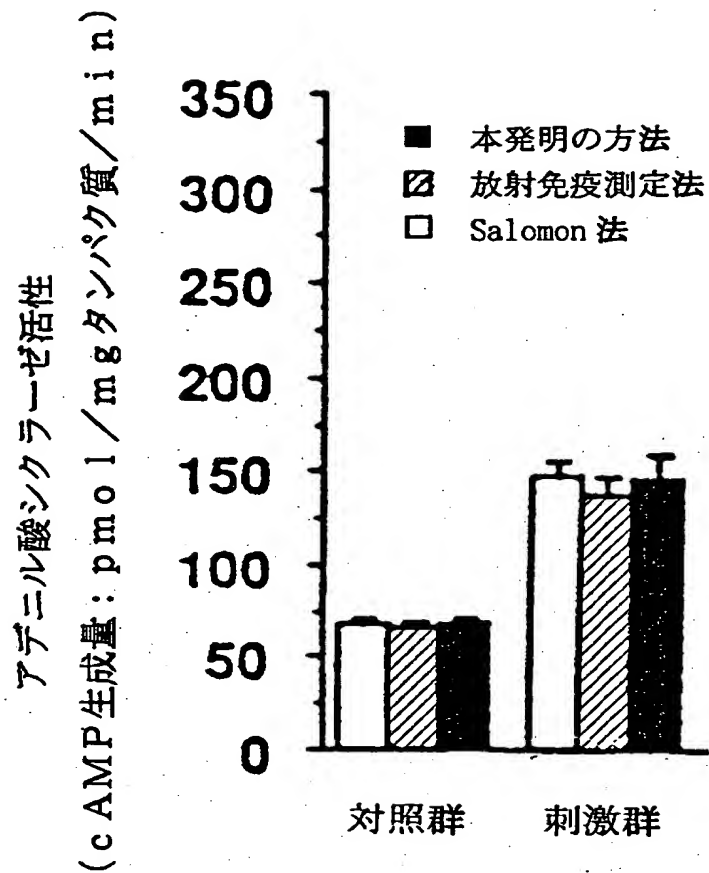


【図3】





【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は内因性の非環状アデニンヌクレオチド類を含む生物学的試料中の cAMP 量またはアデニル酸シクラーゼ活性を、放射性試薬を使用することなく迅速に測定する方法に関する。

【解決手段】 内因性アデニル酸シクラーゼによって生成される cAMP と、ATP、AMP、ADP およびこれらの混合物からなる群から選択される内因性の非環状アデニンヌクレオチド類を含む生物学的試料中の cAMP 量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定方法であって、(1) 上記試料中の cAMP 以外の内因性非環状アデニンヌクレオチドおよびグルコース-6-リン酸を酵素的に除去するためにアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリフォスファターゼの有効量を混合し、(2) cAMP を AMP に酵素的に変換し、(3) 放射性物質を用いることなく AMP の量を測定することを特徴とする方法。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 164284

【提出日】 平成11年 5月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

    【出願番号】 平成11年特許願第 73690号

【補正をする者】

    【識別番号】 000238201

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100062144

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 青山 蓓

【プルーフの要否】 要

【手続補正 1】

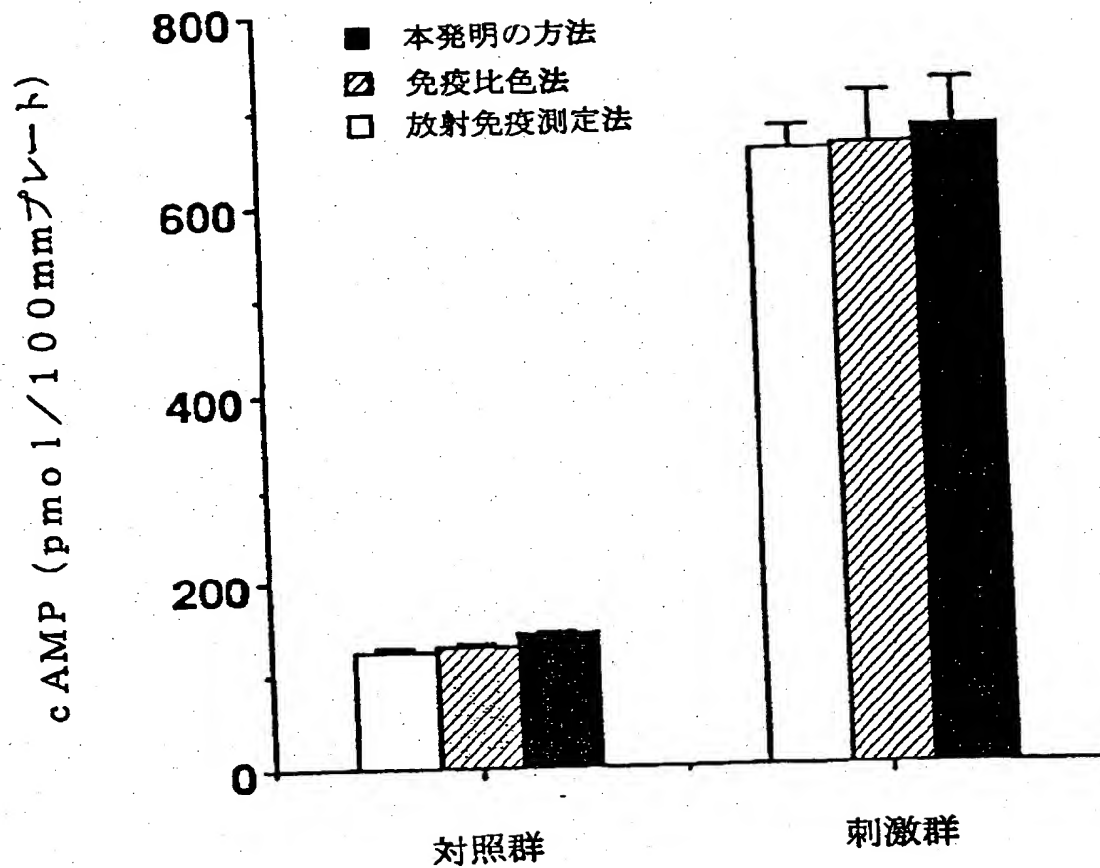
    【補正対象書類名】 図面

    【補正対象項目名】 図 3

    【補正方法】 変更

    【補正の内容】 1

【図3】



【書類名】 手続補正書

【整理番号】 164284

【提出日】 平成11年 8月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

    【出願番号】 平成11年特許願第 73690号

【補正をする者】

    【識別番号】 000238201

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100062144

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 青山 蓓

【ブルーフの要否】 要

【手続補正 1】

    【補正対象書類名】 明細書

    【補正対象項目名】 0 0 1 2

    【補正方法】 変更

    【補正の内容】 1

【手続補正 2】

    【補正対象書類名】 明細書

    【補正対象項目名】 0 0 1 3

    【補正方法】 変更

    【補正の内容】 2

【手続補正 3】

    【補正対象書類名】 明細書

    【補正対象項目名】 0 0 5 2

    【補正方法】 変更

    【補正の内容】 3

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 明細書  
【補正対象項目名】 0054  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】 4

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書  
【補正対象項目名】 0122  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】 5

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書  
【補正対象項目名】 0125  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】 6

## 【0012】

cAMP測定はまた、特定のホルモンまたは調節タンパク質の不存在下あるいは存在下で細胞を試験することによって、細胞の生存度および安定性を評価するために使用することもできる。例えば、グルカゴンによる肝臓細胞(肝細胞)中のcAMPを測定することにより、肝細胞の生存度を評価することができる。これは、例えば、器官および／または細胞の移植、例えば心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、皮膚および脳の細胞移植に有用である。

【0013】

細胞内 cAMP 値を高めるかまたは低下させる多種多様なホルモン、調節タンパク質および医薬品で活性化した後の生検試料から得られる細胞の応答性の測定は、細胞機能を詳細に評価する方法として使用することができる。



## 【0052】

ステップ3-検出オプション反応1(6-ホスホグルコノラク톤の分解)

また、6-ホスホグルコノラク톤は、水性溶媒中、in vitroで加熱して6-ホスホグルコン酸に変換することができ、さらに6-ホスホグルコン酸は、NAD<sup>P+</sup>の存在下でin vitroでNADPH、およびリブローズ-5-リン酸に変換することができる。これにより、NADPHの濃度を高めることができる。このNADPH濃度を上記と同様に例えばTrusらの方法[M.Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)]に従い、蛍光定量法を用いて測定する。

【0054】

さらに、ステップ3-検出サイクル反応2で示したATP-ADPサイクル反応を使用したアデニル酸シクラーゼの測定によって、絶対的な比活性は放射活性および蛍光定量法の両方で同一であることが明らかになった。

## 【0122】

## 1) クリーニング反応(ステップ1-クリーニング反応)

中和した  $3 \mu\text{L}$  容量の筋細胞抽出物(100mmプレートから得られる総溶出物の2.4%または0.24%のいずれか)または  $3 \mu\text{L}$  の cAMP 標準品(0、3.6、7.2、14.4、21.6および28.8pmol/ $20 \mu\text{L}$ )を10×57のPyrex製分析管(岩城硝子製)に加えた。室温にて、Bで調製した25  $\mu\text{L}$  のクリーニング反応混合物(100mMのトリス-HCl(pH8.0); 2mMの $\text{MgCl}_2$ ; 2U/mLのアピラーゼ; 10U/mLのアデノシンデアミナーゼ; 40U/mLのアルカリホスファターゼ)を各分析管に加えた。この混合物を37℃で10分間インキュベートした。次に、90℃で30分間加熱して酵素を不活化した。同様に内部組織ブランクを調製した。

【0125】

4) 検出反応(ステップ3-検出反応2)

サイクル反応の各分析管に、Eで調製した検出反応混合物(100mMのトリス-HCl、pH8.0; 3.2mMのEDTA; 0.6mMのNADP<sup>+</sup>; 1U/mLのホスホグルコイソメラーゼ; 0.5U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)125 $\mu$ Lを添加した。室温で20分間反応後、フルオロメーター(Optical Technology Devices社、ニューヨーク)を使用してNADPHの最終濃度を測定した。フルオロメーターは、10蛍光単位の読み取りが緩衝液(50mMのトリス-HCl、pH8.0)900 $\mu$ L中1nmolのNADPHと等価になるようにセットした。

なお、個々の分析過程は、既知濃度の適当な基質を使用する内部対照を同時に分析することにより確認した(例えば、クリーニング反応をチェックするためにATPを追加して使用し、変換反応を評価するためにAMP標準直線を使用し、サイクル反応を評価するためにはATP標準直線を使用した)。

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 164284

【提出日】 平成12年 2月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第 73690号

【補正をする者】

【識別番号】 000238201

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 稔

【発送番号】 271898

【ブルーの要否】 要

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0113

【補正方法】 変更

【補正の内容】 1

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 図面の簡単な説明

【補正方法】 変更

【補正の内容】 2

【0113】

表2：クリーニング反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
アピラーゼ	4U/mL
アデノシンデアミナーゼ	10U/mL
アルカリホスファターゼ	40U/mL
H <sub>2</sub> O	—

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ATP の標準試料におけるインキュベーション時間に対する蛍光光度測定値を示すグラフである。

【図 2】 cAMP の標準試料の濃度に対する蛍光光度測定値を示すグラフである。

【図 3】 本発明の方法、免疫比色法および放射免疫測定法を用いて cAMP 値を比較測定した結果を示す棒グラフである。

【図 4】 本発明の方法、放射免疫測定法および Salomon 法を用いてアデニル酸シクラーゼ活性を比較測定した結果を示す棒グラフである。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000238201]

1. 変更年月日

1990年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

氏 名

扶桑薬品工業株式会社